

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：82611

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24300138

研究課題名(和文)小脳における各種神経細胞の個性獲得の分子機構

研究課題名(英文)Molecular machinery for neuronal subtype specification in the cerebellum.

研究代表者

星野 幹雄(Hoshino, Mikio)

国立研究開発法人国立精神・神経医療研究センター・神経研究所・病態生化学研究部・部長

研究者番号：70301273

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：小脳をモデル系として、神経幹細胞アイデンティティの時空間制御機構について調べた。小脳菱脳唇の神経幹細胞ではAtoh1が、小脳脳室帯の神経幹細胞ではPtf1aが発現し、その部位での空間アイデンティティを規定することで、それぞれ興奮性神経細胞と抑制性神経細胞を生み出す形質を与えられていることを明らかにした。また、小脳脳室帯の神経幹細胞は、最初にプルキンエ細胞産生神経幹細胞であったものが、その後抑制性インターニューロン産生型神経幹細胞へと形質を変えることを見いだした。その過程では、転写因子Olig2とGsx1が関与することも見いだした。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated two novel knock-in mouse lines, which are designed to express Atoh1 and Ptf1a ectopically in the VZ and RL, respectively. In those mutant mice, we observed glutamatergic and GABAergic neurons ectopically produced from Atoh1-expressing VZ and Ptf1a-expressing RL, respectively, suggesting that spatial identities of cerebellar neuron progenitors are regulated by Atoh1 and Ptf1a.

Within the cerebellar VZ at early stages, we find two types of progenitors; Olig2-expressing Purkinje cell progenitors (PCPs) and Gsx1-expressing Pax2-positive interneuron progenitors (PIPs). As development proceeds, PCPs gradually become PIPs starting from ventral to dorsal. The temporal identity transition of cerebellar GABAergic neuron progenitors from PCPs to PIPs is negatively regulated by Olig2 and positively by Gsx1.

These findings contribute to understanding spatiotemporal control of neuronal progenitor identities by transcription factors.

研究分野：神経科学

キーワード：神経科学 発生・文化 脳・神経

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系には、数千種類もの多様な神経細胞が存在している。それぞれ形質の異なる神経細胞が個々の機能を行わせることによって初めて高次な脳機能が発現されるのだから、「**限られた遺伝情報からいかにして多種多様な神経細胞を分別して生み出すのか**」という問いは、神経科学において非常に重要かつ根源的な問題である。ほとんど全ての神経細胞は発生途上の神経上皮の神経幹細胞（神経上皮細胞とも呼ばれる）から生み出されるが、今までに、様々な移植実験や遺伝子改変動物を用いた実験から、生み出される神経細胞の種類は、それを生み出す神経幹細胞の持つ固有の形質（アイデンティティ）によって決められることが示唆されてきた。申請者は、科学研究費補助金「若手研究 S」の平成 19～23 年度の課題「神経幹細胞アイデンティティの時空間制御による神経細胞多様化の分子戦略」の中で、小脳および後脳背側をモデル系として、この問題に取り組んできた

2. 研究の目的

本研究の目的は、**小脳をモデル系**として、神経幹細胞の持つ固有の形質（アイデンティティ）が、発生途上の個体内でいかにして「時間的・空間的」に制御されているのかを、現象論からその分子機構にまで深めて明らかにすることによって、**神経細胞の個性獲得の分子機構を個体レベル**で理解しようとするものである。先行研究課題である平成 19～23 年度の科研費「若手研究 S」でその分子実体を一部明らかにしたが、残された課題も多い。本研究では、残された課題の中で（1）小脳の神経上皮の空間アイデンティティがいかに制御され、興奮性・抑制性神経細胞の産み分けを可能にしているのか、（2）小脳神経上皮の時間アイデンティティがいかに制御され、小脳の複数種類の抑制性神経細胞が産み分けられているのか、について明らかにする。

3. 研究の方法

（1）先行した「若手 S」の研究から、小脳の神経上皮の神経幹細胞に脳室帯と菱脳唇の 2 カ所の空間アイデンティティがあること、それぞれは Ptf1a および Atoh1 という 2 種類の bHLH 型転写因子によって規定されているのではないかと示唆されていた。そこで、我々は、(i) Atoh1 遺伝子座に Ptf1a をノックインしたマウス、(ii) Ptf1a 遺伝子座に Atoh1 をノックインしたマウス、をそれぞれ作成することによって、菱脳唇で Ptf1a を、脳室帯で Atoh1 を異所性に発現させることに成功した。このマウスを解剖学的、免疫組織化学的に解析する。

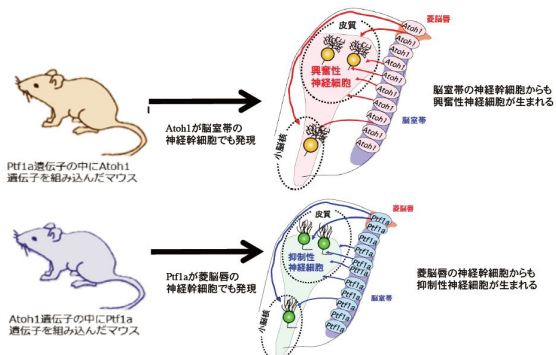
（2）小脳脳室帯から生み出される抑制性神経

細胞の種類がどのように規定されているのかを、この部位の時間アイデンティティの遷移という仮説から明らかにする。この領域では、最初に Olig2 という転写因子が発現し、その後 Gsx1 という転写因子の発現に置き換わることを見いだしたので、この転写因子の発現をマーカーとして時間アイデンティティについてアプローチする。

4. 研究成果

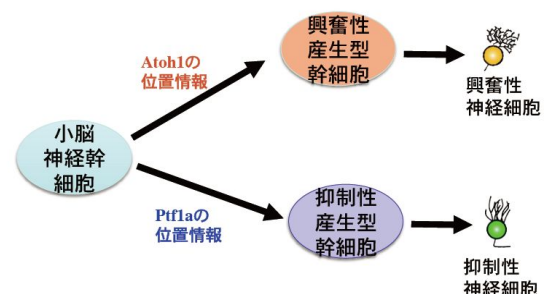
（1）空間アイデンティティについて。

我々は、「**ロックイン**」と呼ばれる遺伝子改変操作によって、「Ptf1a 遺伝子の中に Atoh1 遺伝子を組込んだマウス」と「Atoh1 遺伝子の中に Ptf1a 遺伝子を組込んだマウス」を作製した。この方法では、組込んだ遺伝子が組込まれた遺伝子と同じ場所で発現することを確認した。その結果、前者のマウスでは「菱脳唇でも Ptf1a が発現」し、後者では「脳室帯でも Atoh1 が発現する」していた。これらのマウスを詳しく解析し、前者のマウスにおいては菱脳唇からも抑制性神経細胞が生み出され、後者のマウスにおいては脳室帯からも興奮性神経細胞が生み出されるということを観察した（下図）。



さらに、子宮内エレクトロポレーション法という遺伝子導入法によっても、同様な結果を得ることに成功した。

以上から、神経幹細胞に対して、Ptf1a は「脳室帯としての空間アイデンティティ」を与えて「抑制性神経細胞を生み出す能力」を付与し、Atoh1 は「菱脳唇としての空間アイデンティティ」を与えて「興奮性神経細胞を生み出す能力」を付与していることが明らかになった（下図）。



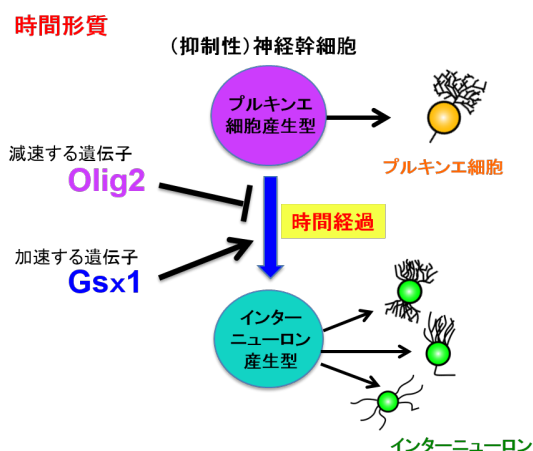
またこれらの実験を進める過程で、Ptf1a および Atoh1 が、お互いの発現を抑制し合っていることもわかり、このことが、小脳において脳室帯と菱脳唇という領域の境界をはっきりさせることに役立っていると考えられた。

(2) 時間アイデンティティについて。
Ptf1aを発現する脳室帯の神経幹細胞からは、プルキンエ細胞や抑制性インターニューロン（ここにはゴルジ細胞、星状細胞、籠状細胞などが含まれる）といった抑制性神経細胞が生み出される。我々は、脳室帯の神経幹細胞の中にOlig2またはGsrx1という転写因子を発現する異なる細胞群が存在するというところを見いだした。また、それぞれの遺伝子にGFPをノックインしたマウスを作成し、それぞれの神経幹細胞から生み出される神経細胞を調べたところ、Olig2を発現するものが「プルキンエ細胞」を生み出す神経幹細胞（プルキンエ細胞産生型）であり、Gsrx1を発現するものが「抑制性インターニューロン」を生み出す神経幹細胞（インターニューロン産生型）であることを明らかにした。

さらに、脳発達の初期段階には大部分の神経幹細胞が「プルキンエ細胞産生型」であるのに、その後、細胞分裂を繰り返す時間的経過に伴って次第に「抑制性インターニューロン産生型」に変化するということを見いだした（下図）。これは言葉を変えて言えば、神経幹細胞の「時間アイデンティティ」が「プルキンエ細胞産生型」から「インターニューロン産生型」へと変化したということである。

また、様々な遺伝子改変マウスの解析から、この神経幹細胞の時間形質の変化がOlig2によって減速され、Gsrx1によって加速されるということも見いだした。

これらの遺伝子機能の増大・減少により、「プルキンエ細胞」および「抑制性インターニューロン」の産生比率に大きな異常をきたしたことから、2種類の遺伝子による神経幹細胞の時間アイデンティティ（時間形質）の変化の制御機構が、小脳の適切な発達に重要であることが明らかになった（下図）。



5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕(計19件)

Eposito G, Yoshida S, Ohnishi R, Tsuneoka Y, Rostagno Mdel C, Yokota S, Okabe S, Kamiya K, Hoshino M, Shimizu M, Venuti P, Kikusui T, Kato T, Kuroda KO: Infant calming responses during maternal carrying in humans and mice. *Curr Biol*, 23 (9): 739-745, 2013. DOI: 10.1016/j.cub.2013.03.041. 査読有

Chonko KT, Jahan I, Stone J, Wright MC, Fujiyama T, Hoshino M, Fritzsche B, Maricich SM: Atoh1 directs hair cell differentiation and survival in the late embryonic mouse inner ear. *Dev Biol*, 381 (2): 401-410, 2013. DOI: 10.1016/j.ydbio.2013.06.022. 査読有

Terakawa YW, Inoue YU, Asami J, Hoshino M, Inoue T: A sharp cadherin-6 gene expression boundary in the developing mouse cortical plate demarcates the future functional areal border. *Cereb Cortex*, 23 (10): 2293-2308, 2013. DOI: 10.1093/cercor/bhs221. 査読有

Worzfeld T, Swiercz JM, Sentürk A, Genz B, Korostylev A, Deng S, Xia J, Hoshino M, Epstein JA, Chan AM, Vollmar B, Acker-Palmer A, Kuner R, Offermanns S: Genetic dissection of plexin signaling in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA*, 111 (6): 2194-2199, 2014. DOI: 10.1073/pnas.1308418111. 査読有

Seto Y, Nakatani T, Masuyama N, Taya S, Kumai M, Minaki Y, Hamaguchi A, Inoue YU, Inoue T, Miyashita S, Fujiyama T, Yamada M, Chapman H, Campbell K, Magnuson MA, Wright CV, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ishiwata S, Ono Y, Hoshino M: Temporal identity transition from Purkinje cell progenitors to GABAergic interneuron progenitors in the cerebellum. *Nat Commun*, 5 : 3337-3337, 2014. DOI: 10.1038/ncomms4337. 査読有

Seto Y, Ishiwata S, Hoshino M: Characterization of Olig2 expression during cerebellar development. *Gene Expr Patterns*, 15 (1): 1-7, 2014. DOI: 10.1016/j.gep.2014.02.001. 査読有

Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M,

Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hoshino M: Cytoskeletal regulation by AUTS2 in Neuronal migration and neuritogenesis. *Cell Rep*, 9 (6): 2166-2179, 2014. DOI: 10.1016/j.celrep.2014.11.045. 査読有

Yamada M, Seto Y, Taya S, Owa T, Inoue YU, Inoue T, Kawaguchi Y, Nabeshima Y, Hoshino M: Specification of spatial identities of cerebellar neuron progenitors by *ptf1a* and *atoh1* for proper production of GABAergic and glutamatergic neurons. *J Neurosci*, 34 (14): 4786-4800, 2014. DOI: 10.1523/JNEUROSCI.2722-13.2014. 査読有

Ito H, Shiwaku H, Yoshida C, Homma H, Luo H, Chen X, Fujita K, Musante L, Fischer U, Frints S G M, Romano C, Ikeuchi Y, Shimamura T, Imoto S, Miyano S, Muramatsu S-I, Kawauchi T, Hoshino M, Sudol M, Arumughan A, Wanker E E, Rich T, Schwartz C, Matsuzaki F, Bonni A, Kalscheuer V M, Okazawa H: In utero gene therapy rescues microcephaly caused by *Pqbp1*-hypofunction in neural stem progenitor cells. *Molecular psychiatry*, 20 (4): 459-471, 2014. DOI: 10.1038/mp.2014.69. 査読有

Nishimura YV, Shikanai M, Hoshino M, Ohshima T, Nabeshima Y, Mizutani K, Nagata K, Nakajima K, Kawauchi T: *Cdk5* and its substrates, *Dcx* and *p27kip1*, regulate cytoplasmic dilation formation and nuclear elongation in migrating neurons. *Development*, 141 (18): 3540-3550, 2014. DOI: 10.1242/dev.111294. 査読有

Wright MC, Reed-Geaghan EG, Bolock AM, Fujiyama T, Hoshino M, Maricich SM: Unipotent, *Atoh1*+ progenitors maintain the Merkel cell population in embryonic and adult mice. *J Cell Biol*, 208 (3): 367-379, 2015. DOI: 10.1083/jcb.201407101. 査読有

Hashimoto R, Hori K, Owa T, Miyashita S, Dewa K, Masuyama N, Sakai K, Hayase Y, Seto Y, Inoue YU, Inoue T, Ichinohe N, Kawaguchi Y, Akiyama H, Koizumi S, Hoshino M: Origins of oligodendrocytes in the cerebellum, whose development is controlled by the transcription factor, *Sox9*. *Mech Dev*, 140:25-40, 2016. DOI: 10.1016/j.mod.2016.02.004. 査読有

Hori K, Nagai T, Shan W, Sakamoto A, Abe

M, Yamazaki M, Sakimura K, Yamada K, Hoshino M: Heterozygous disruption of Autism susceptibility candidate 2 causes impaired emotional control and cognitive memory. *PLoS One*, 10 (12): e0145979, 2015. DOI: 10.1371/journal.pone.0145979. 査読有

Ruffault P-L, D'Autreaux F, Hayes JA, Nomaksteinsky M, Aufran S, Fujiyama T, Hoshino M, Hagglund M, Kiehn O, Brunet J-F, Fortin G, Goridis C: The retrotrapezoid nucleus neurons expressing *Atoh1* and *Phox2b* are essential for the respiratory response to CO₂. *eLife*, 10:7554, 2015. DOI: 10.7554/eLife.07051. 査読有

De Luca A, Parmigiani E, Tosatto G, Martire S, Hoshino M, Buffo A, Leto K, Rossi F: Exogenous Sonic Hedgehog modulates the pool of GABAergic interneurons during cerebellar development. *Cerebellum*, 14 (2): 72-85, 2015. DOI: 10.1007/s12311-014-0596-x. 査読有

Watanabe T, Kakeno M, Matsui T, Sugiyama I, Arimura N, Matsuzawa K, Shirahige A, Ishidate F, Nishioka T, Taya S, Hoshino M, Kaibuchi K: *TBK2* with *EB1/3* regulates microtubule dynamics in migrating cells through *KIF2A* phosphorylation. *J Cell Biol*, 210 (5): 737-751, 2015. DOI: 10.1083/jcb.201412075. 査読有

Yamaguchi M, Watanabe Y, Ohtani T, Uezumi A, Mikami N, Nakamura M, Sato T, Ikawa M, Hoshino M, Tsuchida K, Miyagoe-Suzuki Y, Tsujikawa K, Takeda S, Yamamoto H, Fukada S: Calcitonin Receptor Signaling Inhibits Muscle Stem Cells from Escaping the Quiescent State and the Niche. *Cell Rep*, 13 (2): 302-301, 2015. DOI: 10.1016/j.celrep.2015.08.083. 査読有

Egusa SF, Inoue YU, Asami J, Terakawa YW, Hoshino M, Inoue T: Classic cadherin expressions balance postnatal neuronal positioning and dendrite dynamics to elaborate the specific cytoarchitecture of the mouse cortical area. *Neurosci Res*, 105:49-64, 2015. DOI: 10.1016/j.neures.2015.09.006. 査読有

Leto K, Arancillo M, Becker EB, Buffo A, Chiang C, Ding B, Dobyns WB, Dusart I, Haldipur P, Hatten ME, Hoshino M, Joyner AL, Kano M, Kilpatrick DL,

Koibuchi N, Marino S, Martinez S, Millen KJ, Millner TO, Miyata T, Parmigiani E, Schilling K, Sekerková G, Sillitoe RV, Sotelo C, Uesaka N, Wefers A, Wingate RJ, Hawkes R: Consensus Paper: Cerebellar Development. *Cerebellum*, in press. 査読有

[学会発表](計12件)

星野幹雄: 神経上皮の時空間形質の制御による小脳神経細胞の個性獲得機構. 第4回神経科学と構造生物学の融合研究会. 20131119 - 20131120, 自然科学研究機構岡崎コンファレンスセンター(愛知県岡崎市)

星野幹雄: イハラてんかんラットを用いた神経発生およびてんかんの研究. 第7回ラットリソースリサーチ研究会. 20140131, 京都大学(京都府京都市)

Hoshino M, Hori K: Analysis of the function of a psychiatric disorder-related gene. Joint symposium between Max Planck Institute and National Center of Neurology and Psychiatry. 20141105 - 20141107, Tokyo, Japan

星野幹雄: 各種精神疾患とAUTS2遺伝子をめぐる最近の展開. 第7回CBIR+ONSR共催 若手インスパイアシンポジウム. 20150221, 東京医科歯科大学(東京都)

Hoshino M, Hori K: Analysis of the function of a psychiatric disorder-related gene during development. 12th Biennial Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry. 20140823 - 20140826, Kaohsiung, Taiwan

Hoshino M, Seto Y, Nakatani T, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ono Y, Yamada M: Spatiotemporal regulation of neural progenitor identities by transcription factors. Joint Meeting of the 20th Biennial Meeting of the International Society for Developmental Neuroscience and the 5th Annual NeuroDevNet Brain Development Conference. 20140719 - 20140724, Montreal, Canada

Hoshino M, Seto Y, Nakatani T, Kawaguchi Y, Ikenaka K, Takebayashi H, Ono Y, Yamada M: Spatiotemporal regulation of cerebellar neural progenitor identities by transcription factors. *Neuroscience 2014*, 44th Annual Meeting of Society for Neuroscience. 20141115 - 20141119, Washington DC, USA

Hoshino M, Hori K: Analysis of autism susceptibility candidate 2 gene during development. *Tohoku Forum for Creativity, Frontiers of Brain Science*, "Development and Disease" symposium. 20150824 - 20150826, Sendai, Japan

Hoshino M: Physiological and pathological analyses of an autism-related gene. *EMBO Workshop on Cortical Development in Health and Disease*. 20150426 - 20150429, Rehovot, Israel

星野幹雄: 各種精神疾患とAUTS2遺伝子、そしてヒトの進化. 平成27年度生理学研究所研究会「シナプスの構造構築と機能発現の分子基盤」. 20150618 - 20150619, 生理学研究所(愛知県岡崎市)

星野幹雄: 各種精神疾患とAUTS2遺伝子をめぐる最近の展開. 第6回エビリファイフォーラム. 20160301, 名古屋大学(愛知県名古屋市)

Hoshino M, Nagai T, Shen W, Sakamoto A, Taya S, Hashimoto R, Hayashi T, Abe M, Yamazaki M, Nakao K, Nishioka T, Sakimura K, Yamada K, Kaibuchi K, Hori K: Cytoplasmic function of AUTS2 in neural network formation. *Society for Neuroscience 45th annual meeting*. 20151017 - 20151021, Chicago, IL, USA

[その他]

ホームページ

http://www.ncnp.go.jp/nin/guide/r_diag/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野幹雄 (HOSHINO, Mikio)
国立精神神経医療研究センター・神経研究所・病態生化学研究部・部長
研究者番号: 70301273